

**GENE-BROKEN YEAST****Publication number:** JP2002209574**Publication date:** 2002-07-30**Inventor:** FUKUCHI TAKESHI; YOKOMIZO SATOSHI;  
KOSAKATA FUMIO; MATSUMOTO KEIJI; TAKAGI  
MASAMICHI; OTA AKINORI**Applicant:** KANEYAFUCHI CHEMICAL IND**Also published as:**

- EP1352958 (A1)
- WO02057442 (A1)
- US2006148049 (A)
- CN1498270 (A)
- CA2433650 (A1)

**Classification:**  
**- international:** C12N15/09; C07K14/39; C12N1/19; C12N9/00;  
C12N15/90; C12P7/62; C12R1/72; C12N15/09;  
C07K14/37; C12N1/19; C12N9/00; C12N15/87;  
C12P7/62; (IPC1-7): C12N15/09; C12N1/19; C12P7/62;  
C12N1/19; C12R1/72; C12P7/62; C12R1/72**- european:** C12N9/00L; C12P7/62A**Application number:** JP20010011191 20010119**Priority number(s):** JP20010011191 20010119**Report a data error here****Abstract of JP2002209574**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a yeast in which only a specific gene is broken in impart auxotrophy, in order to use the characteristics of the yeast and construct a substance-producing system useful for industry by gene recombination. **SOLUTION:** An ADE1 gene-broken yeast strain is made by a homologous recombination with a chromosome DNA by the use of an ADE1 gene fragment encoding the phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide-synthesizing enzyme (EC6. 3. 2. 6) of *Candida maltosa*. Further, the broken strain is transformed with a gene-expressing cassette containing a biodegradable polyester-synthesizing enzyme gene, and the obtained transformant is cultured to produce the biodegradable polyester.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-209574

(P2002-209574A)

(43)公開日 平成14年7月30日 (2002.7.30)

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

マークト(参考)

C 12 N 1/19

C 12 N 1/19

4 B 0 2 4

C 12 P 7/62

C 12 P 7/62

4 B 0 6 4

// C 12 N 15/09

Z NA

(C 12 N 1/19

4 B 0 6 5

(C 12 N 1/19

C 12 R 1:72)

C 12 R 1:72)

(C 12 P 7/62

審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全19頁) 最終頁に続く

(21)出願番号

特願2001-11191(P2001-11191)

(71)出願人 000000941

鎌淵化学工業株式会社

大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号

(22)出願日 平成13年1月19日 (2001.1.19)

(72)発明者 福地 健

兵庫県明石市朝霧町3-123セゾン朝霧304

(72)発明者 横溝 聰

兵庫県神戸市垂水区塩屋町6-31-17三青  
荘

(72)発明者 小坂田 史雄

岡山県岡山市大安寺東町17-7

(72)発明者 松本 圭司

兵庫県西宮市大森町11-33

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 遺伝子破壊酵母

(57)【要約】

【課題】 酵母の特性を利用し、かつ遺伝子組み換えによる産業上有用な物質生産系を構築するために、ある特定の遺伝子のみを破壊して栄養要求性を付加した酵母を提供する。

【解決手段】 キャンディダ・マルトーサのホスホリボシルアミノイミダゾール-サクシノカルボキサミド合成酵素(EC 6.3.2.6)をコードするADE1遺伝子断片を用いた染色体DNAとの相同的組換えにより、ADE1遺伝子が破壊された酵母株を作製する。さらに、生分解性ポリエステル合成酵素遺伝子を含んでなる遺伝子発現カセットで当該破壊株を形質転換し、その形質転換体を培養し、生分解性ポリエステルを製造する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ADE1 DNA断片との相同的組換えにより、染色体DNAのADE1遺伝子が破壊された酵母。

【請求項2】 酵母がアシクロコニディウム属、アンブロシオザイマ属、アルスロアスカス属、アルキシオザイマ属、アシュビア属、バブジエビア属、ベンシングトニア属、ボトリオアスカス属、ボトリオザイマ属、ブレッタノマイセス属、ビュレラ属、ビュレロマイセス属、キャンディダ属、シテロマイセス属、クラビスピラ属、クリプトコッカス属、シストフィロバシティウム属、デバリオマイセス属、デッカラ属、ディボダスコブシス属、ディボダスカス属、エニエラ属、エンドマイコベラ属、エレマスカス属、エレモセシウム属、エリスロバシティウム属、フェロマイセス属、フィロバシティウム属、ガラクトマイセス属、ゲオトリクム属、ガイラーモンデラ属、ハンセニアスピラ属、ハンセヌラ属、ハセガワエア属、ホルターマンニア属、ホルモアスカス属、ハイフォビキア属、イサットヘンキア属、クロエケラ属、クロエケラスピラ属、クルイベロマイセス属、コンドア属、クライシア属、クルツマノマイセス属、ロイコスピリディウム属、リポマイセス属、ロデロマイセス属、マラセジア属、メトシュニコヴィア属、ムラキア属、マイクソザイマ属、ナドソニア属、ナカザワエア属、ネマトスピラ属、オガタエア属、オースポリディウム属、パチソレン属、ファチコスピラ属、ファフィア属、ピキア属、ロドスピリディウム属、ロドトルラ属、サッカロマイセス属、サッカロマイコーデス属、サッカロマイコブシス属、サイトエラ属、サカグチア属、サターノスピラ属、シゾプラスストスピリオン属、シゾサッカロマイセス属、シュワニオマイセス属、スピリディオボラス属、スプロボロマイセス属、スプロバキデミア属、ステファノアスカス属、ステリグマトイセス属、ステリグマトイスピリディウム属、シンビオタフリナ属、シンボディオマイセス属、シンボディオマイコブシス属、トルラスピラ属、トリコスピリエラ属、トリコスピロン属、トリゴノブシス属、ツチヤエア属、ウデニオマイセス属、ワルトマイセス属、ウィカーハミア属、ウィカーハミエラ属、ウィリオブシス属、ヤマダザイマ属、ヤロウィア属、ザイゴアスカス属、ザイゴサッカロマイセス属、ザイゴウィリオブシス属、又はザイゴザイマ属のいずれかである請求項1記載のADE1遺伝子破壊酵母。

【請求項3】 酵母がキャンディダ属、ヤロウィア属、クルイベロマイセス属、ハンセニアスピラ属のいずれかである請求項1記載のADE1遺伝子破壊酵母。

【請求項4】 酵母がキャンディダ属である請求項1記載のADE1遺伝子破壊酵母。

【請求項5】 酵母がキャンディダ・マルトーサである請求項4記載のADE1遺伝子破壊酵母。

【請求項6】 酵母がキャンディダ・マルトーサAC16

1 (FERM BP-7366) である請求項5記載のADE1遺伝子破壊酵母。

【請求項7】 同種又は異種の遺伝子を含むDNA配列で形質転換された請求項1～6のいずれか1項に記載の酵母のADE1遺伝子破壊酵母の形質転換体。

【請求項8】 ADE1遺伝子破壊酵母がキャンディダ属である請求項7記載の形質転換体。

【請求項9】 ADE1遺伝子破壊酵母がキャンディダ・マルトーサである請求項8記載の形質転換体。

【請求項10】 ADE1遺伝子破壊酵母がキャンディダ・マルトーサAC16 (FERM BP-7366) である請求項9記載の形質転換体。

【請求項11】 請求項7～10のいずれか1項に記載の形質転換体を培養して得られる培養物から、同種又は異種の遺伝子発現産物を採取することを特徴とする、遺伝子発現産物の製造方法。

【請求項12】 請求項11記載の遺伝子発現産物がポリエステルであることを特徴とする、ポリエステルの製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、酵母のある特定の染色体DNAを相同的組換えの原理により破壊する方法、及び破壊株に関する。また、当該破壊株を用いた産業上有用な物質の生産に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 遺伝子組換え技術の発展により、原核生物や真核生物を利用して産業上有用な物質を大量に製造することが可能となった。真核生物のうち酵母でもサッカロミセス属は、古くから酒類など発酵性食品の生産に利用されてきたほか、キャンディダ・マルトーサ (Candida malto-sa) では、かつて微生物蛋白質として食飼料に利用されたことがあり、酵母自体の安全性も確かめられている。

【0003】 酵母は増殖が速く、一般に細菌よりも高い細胞密度で培養することができる。さらに、酵母は、細菌と比べて菌体と培養液との分離が容易であることから、生産物の抽出精製工程をより簡単にすることも可能である。こうした特性を生かして、酵母は、組換えDNAによる有用生産物の製造宿主として利用されており、その有用性が実証されている。

【0004】 種々の酵母のうち、キャンディダ属酵母はサッカロミセス属と異なり、好気的条件下での培養でエタノールを生成せず、それによる増殖阻害も受けないことから、高密度での連続培養による効率的な菌体製造及び物質生産が可能である。さらに、無胞子酵母キャンディダ・マルトーサは、炭素鎖C<sub>6</sub>～C<sub>10</sub>の直鎖炭化水素やバーム油、ヤシ油等の油脂を唯一の炭素源として資化・生育できるという特性を有している。この特性は、疎水性化学物質の変換による有用物質の生産や反応の場と

して実用上有利であることから、種々の化合物の生産への利用が期待されている（参考図書：Wolf K. 編 Nonconventional Yeasts in Biotechnology. A Handbook, Springer-Verlag, Berlin (1996) p 411-580）。また、その特性を生かしてキャンディダ・マルトーサの遺伝子組換えによる有用物質の生産への利用も期待されており、そのための遺伝子発現系の開発が精力的に行なわれて来た（特開昭62-74287公報、特開昭62-74288号公報、特開平2-72822号公報）。最近では、キャンディダ・マルトーサは、遺伝子組換えにより直鎖ジカルボン酸の生産に利用できることが公開されている（WO99/04014）。

## 【0005】

【発明が解決しようとしている課題】遺伝子組換えによる物質生産の宿主として酵母を用いる場合、大腸菌等を用いる場合と同様、適当な栄養要求性などの選択符号が付加された変異株を取得する必要がある。従来、栄養要求性の付加には、ニトロソグアジニンやエチルメタンスルホン酸などの変異源を用いたランダム変異誘起処理によって変異株を取得していた。しかし、この変異導入法では目的の栄養要求株が取得できるが、変異が目的箇所以外にも入っている可能性が否定できない。この事が、酵母を宿主として開発する場合の障害となり、物質生産の場としての利用が、大腸菌などと比較して遅れている原因といえる。

【0006】例えば、キャンディダ・マルトーサ用の宿主ベクター系は早くから開発され、また、突然変異誘起処理により栄養要求性が付加された変異株が多数取得されているにもかかわらず、組換え体を用いた新たな有用化学物質生産の工業化はされていない。この理由に、野生株と同等の増殖能や直鎖炭化水素鎖の資化性能を持つ適当な栄養要求性を持ったキャンディダ・マルトーサが取得されていないことが挙げられる。キャンディダ・マルトーサを突然変異処理することによって開発されたCHA1株は、ADE1遺伝子とHIS5遺伝子に変異があることが確認されているが（Kawai S. 等、Agric. Biol. Chem. 55: 59-65 (1991)）、増殖能が野生株より劣る。これは目的の箇所以外の変異によるものと考えられている。

【0007】さらに、ランダム変異により取得された変異株のもう一つの問題点に、変異箇所の自然復帰がある。この場合、培養中に復帰株が優先的に増殖するため、組換え菌では物質生産性が落ちることがある。また、復帰株は、自然界に流出した場合、生存・増殖する可能性が高く、安全規準の面から問題がある。従って、ランダム変異導入により取得した菌株を物質の生産の場として利用するのは、適当でない。そこで、ある特定の栄養要求性遺伝子のみ破壊された破壊株の取得が望まれ

ていた。

【0008】先に述べたように、キャンディダ・マルトーサの変異株として、ADE1遺伝子やヒスチジノール-ホスフェートアミノトランスフェラーゼ（HIS5遺伝子）、オロチシン-5'-ホスフェートデカルボキシレース（URA3遺伝子）などの遺伝子変異株が多数取得されている（参考図書：Wolf K. 編 Nonconventional Yeasts in Biotechnology. p 411-580）。しかし、ある特定の遺伝子のみを破壊することにより栄養要求性を付加したキャンディダ・マルトーサは、現在まで得られていない。酵母の特性を利用し、かつ遺伝子組換えによる産業上有用な物質生産系を構築するためには、そのような遺伝子破壊株が望まれていた。また、キャンディダ・マルトーサに限らず、そのような遺伝子破壊株が望まれている。

【0009】さらに、キャンディダ・マルトーサにおいては、直鎖炭化水素、バーム油、ヤシ油等の油脂を唯一の炭素源として資化・生育するという特性を生かした産業上有用な物質の生産が期待されていた。

## 【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者等は、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、遺伝子組換えの手法を駆使することにより、酵母のホスホリボシリアルミノイミダゾール-サクシノカルボキサミド合成酵素（EC 6.3.2.6）をコードするDNA（ADE1遺伝子）断片を用いた染色体DNAとの相同的組換えの原理による、ADE1遺伝子破壊株の作製を行い、アデニン要求性酵母の取得に成功した。そして、当該遺伝子破壊

30 酵母の増殖能と遺伝子発現能力をキャンディダ・マルトーサの突然変異処理によるADE1遺伝子変異株のCHA1と比較し、CHA1株より両能力が優れていることを示すことにより、本発明を完成するに至った。

【0011】すなわち、本発明はADE1DNA断片との相同的組換えにより、染色体DNAのADE1遺伝子が破壊された酵母に関する。また、同種又は異種の遺伝子を含むDNA配列で形質転換されたADE1遺伝子破壊酵母の形質転換体に関する。

【0012】さらにより詳しくいえば、キャンディダ・マルトーサのADE1遺伝子破壊株に異種遺伝子発現系を導入した形質転換体を取得することにより、産業上有用な物質の生産に利用する方法を提供する。具体的には、生分解性ポリエステルとして有用性のある3-ヒドロキシブチレート（以下、3HBと略記する）と3-ヒドロキシヘキサノエート（以下、3HHと略記する）との2成分共重合ポリエステル（以下、P(3HB-co-3HH)と略記する）を合成する酵素である、ポリエステル重合酵素遺伝子とエノイル-COAヒドラターゼ遺伝子発現系を本発明のキャンディダ・マルトーサのADE1遺伝子破壊株に導入し、これにより、P(3HB

-co-3HH)を生産することに成功し、当該ADE1遺伝子破壊キャンディダ・マルトーサの有用性を示すことができた。すなわち、本発明はまた、ADE1遺伝子破壊株の形質転換体を用いるポリエステルの製造方法であって、上記形質転換体を培養して得られる培養物から、ポリエステルを採取するポリエステルの製造方法である。以下、本発明について詳細に説明する。

## 〔0013〕

【発明の実施の形態】相同意組換えによるADE1遺伝子破壊を行う酵母には特に制限はなく、菌株の寄託機関(例えはIFO、ATCC等)に寄託されているアシクロコニディウム属(*Aciculonconidium*属)、アンブロシオザイマ属(*Ambrosiozyma*属)、アルスロアスカス属(*Arthroascus*属)、アルキシオザイマ属(*Arxiozyma*属)、アシュビア属(*Ashbya*属)、バブジエビア属(*Babjevia*属)、ベンシングトニア属(*Bensingtonia*属)、ボトリオアスカス属(*Botryoascus*属)、ボトリオザイマ属(*Botryozyma*属)、ブレッタノマイセス属(*Brettanomyces*属)、ビュレラ属(*Bullera*属)、ビュレロマイセス属(*Bulleromyces*属)、キャンディダ属(*Candida*属)、シテロマイセス属(*Citeromyces*属)、クラビスピラ属(*Clavispora*属)、クリプトコッカス属(*Cryptococcus*属)、シストフィロバシディウム属(*Cystofilobasidium*属)、デバリオマイセス属(*Debaryomyces*属)、デッカラ属(*Dekkara*属)、ディボダスコブシス属(*Dipodascopsis*属)、ディボダスカス属(*Dipodascus*属)、エニエラ属(*Eeniella*属)、エンドマイコブセラ属(*Endomycopsisellae*属)、エレマスカス属(*Eremascus*属)、エレモセシウム属(*Eremothecium*属)、エリスロバシディウム属(*Erythrobasisidium*属)、フェロマイセス属(*Fellomyces*属)、フィロバシディウム属(*Filobasidium*属)、ガラクトマイセス属(*Galactomyces*属)、ゲオトリクム属(*Geotrichum*属)、ガイラーモンデラ属(*Guilliermondella*属)、ハンセンיאスピラ属(*Hanseniaspora*属)、ハンセンユラ属(*Hansenula*属)、ハセガワエア属(*Hasegawaea*属)、ホルターマンニア属(*Holtermannia*属)、ホルモアスカス属(*Hormoascus*属)、ハイフォビキア属(*Hypopichia*属)、イサットヘンキア属(*Issatchenkia*属)、クロエケラ属(*Kloeckera*属)、クロエケラスボラ属(*Kloeckerasp*

*ora*属)、クルイベロマイセス属(*Kluyveromyces*属)、コンドア属(*Kondoa*属)、クライシア属(*Kuraishia*属)、クルツマンマイセス属(*Kurtzmanomyces*属)、ロイコスボリディウム属(*Leucosporidium*属)、リポマイセス属(*Lipomyces*属)、ロデロマイセス属(*Lodderomyces*属)、マラセジア属(*Malassezia*属)、メトシュニコウイア属(*Metschnikowia*属)、ムラキア属(*Mraakia*属)、マイクソザイマ属(*Myxozyma*属)、ナドソニア属(*Nadsonia*属)、ナカザワエア属(*Nakazawaea*属)、ネマトスボラ属(*Nematospora*属)、オガタエア属(*Ogataea*属)、オースボリディウム属(*Oosporidium*属)、パチソレン属(*Pachysolen*属)、ファチコスボラ属(*Phachytichospora*属)、ファフィア属(*Phaffia*属)、ピキア属(*Pichi*属)、ロドスボリディウム属(*Rhodosporidium*属)、ロドトルラ属(*Rhodotorula*属)、サッカロマイセス属(*Saccharomyces*属)、サッカロマイコブシス属(*Saccharomycodes*属)、サッカロマイコブシス属(*Saccharomyopsis*属)、サイトエラ属(*Saitoella*属)、サカグチア属(*Sakaguchiia*属)、サターンスボラ属(*Saturnospora*属)、シゾblastosporion属(*Schizoblastosporion*属)、シゾサッカロマイセス属(*Schizosaccharomyces*属)、シュワニオマイセス属(*Schwanomyces*属)、スボリディオボラス属(*Sporidiobolus*属)、スボロボロマイセス属(*Sporobolomyces*属)、スボロバキデミア属(*Sporopachydermia*属)、ステファノアスカス属(*Stephanoascus*属)、ステリグマトイセス属(*Sterigmatomyces*属)、ステリグマトイセス属(*Sterigmatosporidium*属)、シンビオタフリナ属(*Symbiotaphrina*属)、シンボディオマイセス属(*Sympodiomyces*属)、シンボディオマイコブシス属(*Sympodiomycodes*属)、トルラスボラ属(*Torulaspora*属)、トリコスボリエラ属(*Trichosporiella*属)、トリコスボロン属(*Trichosporon*属)、トリゴノブシス属(*Trigonopsis*属)、ツチヤエア属(*Tsuchiyaea*属)、ウデニオマイセス属(*Udenomyces*属)、ワルトマイセス属(*Waltomyces*属)、ウィカーハミア属(*Wickerhamia*属)、ウィカーハミエラ属(*Wickerha*

*miellia*属), ウィリオブシス属 (*Williopsis*属), ヤマダザイマ属 (*Yamadazyma*属), ヤロウィア属 (*Yarrowia*属), ザイゴアスカス属 (*Zygoascus*属), ザイゴサッカロマイセス属 (*Zygosaccharomyces*属), ザイゴウィリオブシス属 (*Zygowilliopsis*属) 又はザイゴザイマ属 (*Zygozyma*属)などの酵母を使用することができる。

【0014】これら酵母の中でも、高密度での連続培養による効率的な菌体製造及び物質生産が可能である点で、キャンディダ属、ヤロウィア属、クルイベロマイセス属、ハンセンヌラ属などが好ましく、特に、宿主-ベクター系の研究が進んでおり、簡便に系が利用できること、また、直鎖炭化水素や油脂等の資化能力が高い点で、キャンディダ属が好ましい。

【0015】また、本発明のADE1破壊株作製及びその利用に関しては1例として、キャンディダ・マルトーサを用いた。

【0016】本発明に用いるキャンディダ・マルトーサの野生株 IAM 12447 は、東京大学応用微生物学研究所、あるいはATCC 28140としてAmerican Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) から入手できる。また、キャンディダ・マルトーサのアデニン及びヒスチジン栄養要求マーカー変異株であるCHA1株はATCC 90625として上記の機関から入手できる。

【0017】本発明で得られたADE1遺伝子破壊株キャンディダ・マルトーサAC16株は、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所内特許微生物寄託センターにFERM BP-7366の受託番号で国際寄託されている。

【0018】相同的組換えとは、DNAの塩基配列が類似の配列又は同じ配列(相同配列)を持つ部分で起こる組換えを示す。

【0019】遺伝子破壊とは、ある遺伝子の機能が発揮できないようにするために、その遺伝子の塩基配列に変異を入れる、別のDNAを挿入する、あるいは、遺伝子のある部分を欠失させることを示している。遺伝子破壊の結果、その遺伝子がmRNAへ転写できなくなり、構造遺伝子が翻訳されない、あるいは、転写されたmRNAが不完全なため、翻訳された構造蛋白質のアミノ酸配列に変異又は欠失が生じ、本来の機能の発揮が不可能になる。

【0020】ADE1遺伝子とは、プロモーター領域を含む5'非翻訳領域とホスホリボシリアルアミノイミダゾール-サクシノカルボキサミド合成酵素(EC 6.3.2.6)をコードする領域並びにターミネーター領域を含む3'非翻訳領域からなる遺伝子断片を示す。キャンディダ・マルトーサのADE1遺伝子の塩基配列はGenBank:D00855に公開されており、配列番号

1にDNA配列を示した。

【0021】ADE1DNA断片とは、微生物細胞内で染色体上のADE1遺伝子と相同的組換えを起こすことができ、それによってADE1遺伝子を破壊できるDNAを示している。

【0022】ADE1酵素とは、ホスホリボシリアルアミノイミダゾール-サクシノカルボキサミド合成酵素(EC 6.3.2.6)を示す。

【0023】同種遺伝子とは、宿主酵母の染色体上に存在している遺伝子またはその一部のDNAを意味する。異種遺伝子とは、宿主酵母の染色体上に本来存在しない遺伝子またはその一部のDNAを意味する。

【0024】遺伝子発現カセットとは、転写プロモーター-DNA配列、発現を目的とする遺伝子をコードするDNA、及び転写を終結するターミネーターを含むDNAから構成される環状プラスミド状のもので染色体外で機能するものと、染色体DNAに組み込むタイプがある。

【0025】遺伝子発現産物とは、遺伝子によって発現される物質(遺伝子発現物)が所望の蛋白質や酵素の場合、それ自体が遺伝子発現産物である。また、遺伝子発現物が各種酵素類や補酵素類であり、該酵素類が宿主酵母内で触媒活性を発現することにより生産される、遺伝子発現物とは直接異なる物質も遺伝子発現産物である。

【0026】PHAとは、ポリヒドロキシアルカノエートの略であり、3-ヒドロキシアルカン酸の共重合した、生分解性ポリエステルを示している。

【0027】ORF2とは、アエロモナス・キャビエ由来のポリエステル重合酵素をコードする遺伝子(特開平10-108682)を、キャンディダ・マルトーサで発現するように設計したDNAを示している。配列番号6にその塩基配列を示した。

【0028】ORF3とは、アエロモナス・キャビエ由来のエノイルCoAヒドラターゼをコードする遺伝子(特開平10-108682)を、キャンディダ・マルトーサで発現するように設計したDNAを示している。配列番号7にその塩基配列を示した。

【0029】以下に、ADE1遺伝子破壊株の作製方法、該破壊株によるポリエステルの製造方法の一例を説明する。

【0030】(1) ADE1遺伝子破壊株の作製方法  
遺伝子破壊株作製に関しては、ADE1酵素が発現しない破壊株が得られればいかなる方法も用いることが可能である。遺伝子破壊の方法は種々の方法が報告されているが、ある特定の遺伝子のみ破壊できるという点で、相同的組換えによる遺伝子破壊が好ましい(Nickoloff J. A. 編 *Methods in Molecular Biology*, 47: 291-302 (1995) , Human Press Inc., Totowa, NJ)。相同的組換えの中でも、自然復帰しない破壊株が取得でき、その結果、組換え体を取り

扱う上で安全性が高い菌株が得られる、という点で、1段階破壊法 (one-step gene disruption) が好ましい。

【0031】1段階破壊法に使用するADE1 DNA断片は、通常、遺伝子内部の部分DNAを除去し、残った両端部分を再度連結した形のDNA断片が用いられる。このDNA断片を作製するためには、例えば、PCR法(ポリメラーゼ連鎖反応法)や、ベクターからの制限酵素による切り出しと再連結によって調製できる。ADE1 DNA断片の両端の相同性領域長は、10塩基以上あればよく、好ましくは200塩基以上、より好ましくは300塩基以上である。また、両端それぞれの相同性は、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上である。

【0032】除去する部分DNAは、除去によりADE1遺伝子が酵素活性を発揮できなくなる部分であり、且つ自然復帰によりADE1酵素活性が回復しない長さのDNAである。このような部分DNAの鎖長は特に限定しないが、好ましくは50塩基以上、より好ましくは100塩基以上である。

【0033】本発明では、約553bpのADE1酵素をコードするDNA断片を除去し、5'側630bpDNA断片と3'側400bpのDNA断片を連結した破壊用DNAを用いた(図1)。除去した部分はADE1酵素蛋白質の約80%にあたる。また、5'側及び3'側のDNA断片と元のADE1遺伝子との相同性は両DNAとも100%である。本発明で用いた破壊用DNA断片の塩基配列を配列番号2に示した。

【0034】本発明の用いたDNA断片の調製は、pUC119-ADE1(Kawai S.等、*Agric. Biol. Chem.*、55:59-65(1991))を用いて行った。すなわち、プラスミドpUC119-ADE1で形質転換された大腸菌を培養し、それよりプラスミドを調製する。このプラスミドから適当な制限酵素でADE1遺伝子の構造遺伝子(ADE1酵素蛋白質をコードする遺伝子)の1部分を除去するように切断し、ベクター側を回収し再度リガーゼを用いて連結する。このようにして破壊用DNAを含むベクターができる。

【0035】破壊用DNAを含むベクターは適当な大腸菌、例えばJM109やDH5 $\alpha$ に導入し、該大腸菌を大量培養し、それより塩化セシウム超遠心法により高純度のプラスミドを大量調製する(Sambrook等編、*Molecular cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition 1.42-1.47, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))。このベクターを直接遺伝子破壊に用いることができるが、1段階破壊法を行うため、精製したベクターよりADE1領域を含む相同性のある部分を適

当な制限酵素で切り出し、それを破壊用DNAとして利用するのが望ましい。本発明では、制限酵素SalIで切断し、DNA断片を精製することなく菌体内に導入することにより相同的組換えによってADE1遺伝子を破壊することができた。

【0036】キャンディダ・マルトーサの形質転換法には、プロトプラスト法、酢酸リチウム法(Takagi M.等、*J. Bacteriol.* 167:551-5(1986))、電気パルス法(Kasuske A.等、*Yeast* 8:691-697(1992))が知られているが、本発明では電気パルス法を用いて行った。電気パルス発生には市販の機器が利用できる。本発明では、BTX社(San Diego, CA USA)製のELECTRO CELL MANIPULATOR 600を用いた。キュベットはBIO MEDICAL CORPORATION CO. LTD (Tokyo Japan)製のBM6200(2mm gap blue cap)を用いた。電気パルス後、適当な培地で培養し、得られた培養菌体より目的の

10 ADE1破壊株をスクリーニングする。

【0037】形質転換体を取得する種々の方法が開発されているが、そのうちナイスチチン濃縮(Snow R. *Nature* 211:206-207(1966))と呼ばれる方法を利用することができる。本法は、酵母からランダム変異により得られる変異株を効率的に選択するために開発された方法であるが、遺伝子破壊株にも応用できると考えられる。例えば、本発明の好ましい態様によれば、電気パルス後、培養した菌体を最少培地等に植菌し培養する。菌を洗浄し、窒素源不含最

20 少培地で培養後、窒素源含有最少培地で短時間培養する。この培養液に直接ナイスチチンを添加し、1時間30°Cで好気的に培養することにより、野生株を優先的に殺傷できる。この菌液を適当な寒天培地プレートに塗抹し、30°Cで2日間程度培養すると、赤色コロニーが得られる。

【0038】得られた赤色コロニーから、PCR法やゲノミックサザンハイブリダイゼーション法(Sambrook等編、*Molecular cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition 9.31-9.57, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))により容易に遺伝子破壊を確認することができる。PCR法では、ADE1遺伝子の両端をプライマーに用いると、アガロースゲル電気泳動において、野生株では正常な大きさのDNAバンドが検出されるが、破壊株では欠失させた配列分だけ短いバンドが検出される。本発明では、約1kbのDNAバンドが検出された。しかし、遺伝子破壊などの染色体DNAとの置換や組み込みの場合、遺伝子が目的以外の箇所、例えれば相同性の高い未知の部分に挿入される可能性を想定

すべきであり、その場合、PCR法では確認できない場合がある。PCR法は得られた破壊株が多い場合に、候補株を選択する手段として用いるのが望ましい。

【0039】破壊株等を確認するためには、ゲノミックサザン解析が必須である。本法を行うことにより、容易にかつ確かに目的箇所だけに遺伝子の組換えが生じたことを証明することができる。破壊株とコントロールとしての野生株の染色体DNAを調製し、適当な制限酵素で切断後アガロースゲル電気泳動を行う。本発明では、2種類の制限酵素を用い3種類の切断方法で確認を試みた。アガロースゲルからDNAをナイロン膜上に移したり、破壊株のゲノム上に残っていると考えられるADE1遺伝子の制限酵素HpaI NdeI 切断DNA断片270 bpをGene Imageラベリング・検出キット(アマシャム社製)を用いて、添付の説明書にしたがって酵素標識し、サザンハイブリダイゼーション検出用プローブとした。ハイブリダイズ後、洗浄し、添付の説明書に従って蛍光発色試薬でDNAバンドを検出した。検出バンドを野生株(IAM12247)のものと比較した。その結果、2株が3種類の切断方法で、ADE1遺伝子内部の550 bp分が短くなっていることが確認できた。

【0040】得られたADE1遺伝子破壊株は、ADE1酵素を合成できないため、ATPの前駆体であるアデニンを合成できない。従って、アデニンを含まない培地や、アデニンの無い環境下では生存はできない。

【0041】得られたADE1遺伝子破壊株の1株をキャンディダ・マルトーサAC16と命名した。

(2) ADE1遺伝子破壊株による異種遺伝子発現：ポリエステルの生産方法

本発明で得たADE1破壊株を用いて同種遺伝子あるいは異種遺伝子を発現させることができる。酵母は、大腸菌ではできない糖鎖付加蛋白質を培地中に分泌することができるため、ADE1破壊株を用いてこのような蛋白質の生産が可能である。

【0042】導入できる同種遺伝子は特に限定しないが、例えば、産業上有用な生産物の製造例として、WO99/04014に公開されているような、キャンディダ・マルトーサに同株由来のP450酵素遺伝子を導入することによる、ジカルボン酸の製造が挙げられる。また、異種遺伝子も特に限定はしないが、例えば、リバーゼ遺伝子、アミラーゼ遺伝子等の導入による、当該蛋白質の製造が挙げられる。

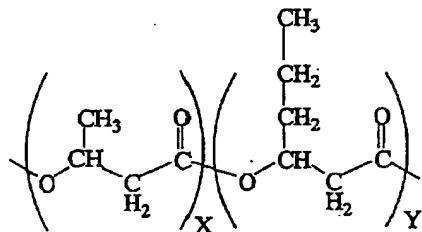
【0043】本発明に用いたキャンディダ・マルトーサ等の一部のキャンディダ属酵母においては、mRNAから蛋白質が翻訳される段階で、一部コドンの翻訳のされ方が他の生物と異なっていることが知られている。キャンディダ・マルトーサではロイシンコドンのCUGがセリンに翻訳されるため(Ohamma T. 等, Nucl. Acid Res., 21: 40394045

(1993))、大腸菌由来lacZ遺伝子が、活性を持つβガラクトシダーゼに翻訳されない(Sugiyama H. 等, Yeast 11: 43-52 (1995))。このように異種遺伝子を発現させる場合には、それがキャンディダ・マルトーサ内で機能を持つ蛋白質に翻訳されるという保証はない。従って、キャンディダ・マルトーサを宿主として異種遺伝子を発現させる場合、原則としてロイシンコドンのみ変換すれば良いが、さらに効率よく発現させるため他のアミノ酸コドンをキャンディダ・マルトーサのものに合わせても良い。コドンの変換は、例えばWolf K. 編 Nonconventional Yeasts in Biotechnology. の中のMauersberger S. 等著, Candida maltosa p52 4-527 を参考にして行えれば良い。

【0044】ポリエステル合成に関与する遺伝子としては、下記一般式のポリエステルの合成に関与する遺伝子であればどのような遺伝子でも良い。下記一般式はポリエステルP(3HB-co-3HH)の構造式を示していく。X及びYは整数であり、それぞれ3HBと3HHの重合個数を示す。

【0045】

【化1】



例えば、特開平10-108682号公報に記載されているポリエステル重合酵素遺伝子断片を用いることができる。また、本ポリエステル重合酵素遺伝子と共にポリエ斯特合成に関与する遺伝子を導入しても良い。これらの遺伝子としては、たとえば、β酸化経路の中間体のエノイル-CoAを(R)-3-ヒドロキシアル-CoAに変換する(R)体特異的エノイル-CoAヒドロターゼ(Fukui T. 等, FEMS Microbiology Letters, 170: 69-75 (1999)、特開平10-108682号公報)や、アセチル-CoAを二量化して3-ヒドロキシブチリル-CoAを合成するβケトチオラーゼ・NADH依存性ヒドロターゼ遺伝子(Peoples OP等, J. Biol. Chem. 264: 15298-15303 (1989))などが挙げられる。これらの遺伝子は実質的な酵素活性を有する限り、当該遺伝子の塩基配列に欠失、置換、挿入等の変異が生じていても良いものとする。但し、異種遺伝子の場合、上記したようにキャンディダ・マルトーサ内で機能を持つ蛋白質に翻訳されると

いう保証はないため、アミノ酸コドンを変更する必要がある。

【0046】本研究ではアエロモナス・キャビエ由来のポリエステル重合酵素とエノイル-CoAヒドラターゼ(特開平10-108682公報、Fukui T.等、FEMS Microbiology Letters, 170: 69-75 (1999) を用いた。しかし、本酵素遺伝子が正常に翻訳されず、酵素活性を示さない可能性が高いため、両酵素のアミノ酸コドンをキャンディダ・マルトーサの最適コドンに合わせDNAを全合成した。アエロモナス・キャビエ由来のポリエステル重合酵素とエノイル-CoAヒドラターゼの全合成DNA配列を、それぞれ配列表の配列番号6と7に示した。ただし、これらの配列番号に示した塩基配列は、これに限定されるものではなく、当該酵素のアミノ酸配列がキャンディダ・マルトーサ内で発現される塩基配列であれば、いかなる塩基配列でも用いることができる。

【0047】酵母における遺伝子発現カセットは、当該遺伝子の5'側上流にプロモーター、5'上流域活性化配列(UAS)等のDNA配列の連結、当該遺伝子の3'下流にポリA付加シグナル、ターミネーター等のDNA配列の連結して作製する。これらのDNA配列は当該酵母で機能する配列であればどのような配列でも利用できる。

【0048】プロモーターには恒常に発現を行うものや誘導的に発現を行うものがある。いずれのプロモーターを用いても良いが、宿主と同じキャンディダ・マルトーサ由来であることが望ましい。一例として、キャンディダ・マルトーサのALK1プロモーター及びALK1ターミネーター(GenBank D00481) (Takagi M.等、Agric. Biol. Chem., 53: 2217-2226 (1989))を利用することができます。

【0049】本発明の形質転換用いられる遺伝子発現カセットは一例として、次のように構築することができる。構築に用いるベクターは、大腸菌において自律増殖するプラスミドであればどのようなベクターでもよく、更に酵母において自律増殖可能な領域を合わせ持っていても良い。酵母において自律増殖できるベクターは、菌体内に保持されることが知られている。また、遺伝子発現カセットを染色体に組み込むこともできる。一例としてキャンディダ・マルトーサにおいて自律増殖可能なpUTU1を用いることができる(M. Ohkuma, et al. J. Biol. Chem., vol. 273, 3948-3953 (1998))。

【0050】本発明では、ORF2及びORF3のそれぞれ5'上流にキャンディダ・マルトーサのALK1遺伝子のプロモーターALK1p(配列番号8)、ターミネーターALK1t(配列番号9)を連結した。

【0051】プロモーターおよびターミネーターと構造

遺伝子を連結するための制限酵素部位を調製するためには、PCR法が利用できる。PCRに用いるプライマー配列は配列番号10から配列番号13に示す。PCRの条件は目的遺伝子断片が増幅できればどのような条件を用いても良い。

【0052】プロモーター部分は配列番号8を鋳型にして配列番号10と配列番号11を用いて、5'末端がSalI、3'末端がNdeIのALK1pを作製することができる。ターミネーター部分は配列番号9を鋳型にして配列番号12と配列番号13を用いて、5'末端がHindIII、3'末端がEcoRVのALK1tを作製することができる。ベクターにはpUTU1とキャンディダ・マルトーサのAdel1遺伝子を用いて、マーカー遺伝子をウラシルからアデニンに変更したベクターpUTA1を使用することができる。pUCNT(WO94/03613に記載)のPvuII、NdeIサイトにALK1tを結合し、またpUCNTのHindIII、SspIサイトにALK1tを結合してpUAL1を構築することができる。次にpUAL1のNdeI、PstIサイトにORF2を結合し、プラスミドpUAL-ORF2を構築することができる。また、pUAL1を構築する途中に構築するpUCNT-ALK1tのNdeI、HindIIIサイトにORF3を結合し、さらにALK1pを結合することで、pUAL-ORF3を構築することができる。

【0053】つぎに、プラスミドpUAL-ORF2からEcoT22Iを用いて、ORF2とともに上流にあるプロモーター、下流にあるターミネーターと一緒に切り出し、pUTA1のPstIサイトに結合し、pUTA-ORF2を構築することができる。さらに、pUAL-ORF3からSalIを用いてORF3とともに上流にあるプロモーター、下流にあるターミネーターと一緒に切り出し、pUTA-ORF2のSalIサイトに結合したプラスミドpUTA-ORF23(図2上)を構築することができる。以上的方法により、キャンディダ・マルトーサにおいてポリエステルを製造するための遺伝子発現カセットを構築することができる。

【0054】本発明の菌株に、前述の形質転換法を用いて遺伝子発現カセットを形質転換し、pUTA-ORF23を有するキャンディダ・マルトーサAC16(ORF23)株を作製することができる。

【0055】ポリエステル合成に関与する遺伝子発現カセットで形質転換された酵母を培養することによるポリエステルの製造は、次のようにして行うことができる。培養に用いる炭素源としては、酵母が資化できるものであればどのようなものでも良い。また、プロモーターの発現が誘導型である場合には、適時誘導物質を添加すれば良い。誘導物質が主要炭素源である場合もある。炭素源以外の栄養源としては窒素源、無機塩類、その他の有機栄養源を含む培地が使用できる。培養温度はその菌の

50

生育可能な温度であれば良いが、20°Cから40°Cが好ましい。培養時間には特に制限はないが、1~7日程度で良い。その後、得られた培養菌体又は培養物からポリエステルを回収すれば良い。

【0056】炭素源としてはグルコース、グリセリン、シュークロース等の炭水化物や油脂類や脂肪酸類、さらにはn-アルカン等を用いることができる。油脂としては、例えばナタネ油、ヤシ油、バーム油、バーム核油などが挙げられる。脂肪酸としてはヘキサン酸、オクタン酸、デカン酸、ラウリン酸、オレイン酸、バルミチン酸、リノール酸、リノレン酸、ミリスチン酸などの飽和・不飽和脂肪酸、あるいはこれら脂肪酸のエステルや塩など脂肪酸誘導体が挙げられる。一例としてキャンディダ・マルトーサの培養において、炭素源として油脂を用いて培養することもできる。また、資化ができないかまたは効率よく資化できない油脂の場合、培地中にリバーゼを添加することによって改善することもできる。さらに、リバーゼ遺伝子を形質転換することにより、油脂資化能を付与することもできる。

【0057】窒素源としては、例えばアンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等のアンモニウム塩の他、ペプトン、肉エキス、酵母エキスなどが挙げられる。無機塩類としては、例えばリン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウムなどが挙げられる。

【0058】他の有機栄養源としてはアミノ酸類、例えばグリシン、アラニン、セリン、スレオニン、プロリンなどや、ビタミン類、例えばビタミンB1、ビタミンB12、ビオチン、ニコチニ酸アミド、バントテン酸、ビタミンC等が挙げられる。

【0059】ポリエステルの菌体からの回収は多くの方法が報告されている。本発明においては、例えば、次のような方法が使用できる。培養終了後、培養液を遠心分離器などで菌体を分離・回収し、その菌体を蒸留水およびメタノール等により洗浄した後、乾燥させる。この乾燥菌体をクロロホルム等の有機溶剤を用いてポリエステルを抽出する。このポリエステルを含んだ有機溶剤溶液を濾過等によって菌体成分を除去し、そのろ液にメタノールやヘキサン等の貧溶媒を加えてポリエステルを沈殿させる。沈殿したポリエステルを濾過や遠心分離によって上澄み液を除去し、乾燥させてポリエステルを回収することができる。

【0060】得られたポリエステルの分析は、例えば、ガスクロマトグラフ法や核磁気共鳴法などにより行うことができる。

【0061】以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。ただし、本発明は、これら実施例にその技術範囲を限定するものではない。

【0062】

【実施例】酵母菌の培養用に使用した試薬は、特に断らない限り和光純業から販売されているものを用いた。

【0063】(培地組成)

L B 培地：10 g/L トリプトン、5 g/L 酵母エキス、5 g/L 食塩。L B プレートの場合は、寒天を16 g/L になるように加える。

Y P D 培地：10 g/L 酵母エキス、20 g/L ポリペプトン、20 g/L グルコース。Y P D プレートの場合は、寒天を20 g/L になるように加える。アデニン含有Y P D 培地の場合は、アデニンを0.1 g/L 加える。

Y M 培地：3 g/L 酵母エキス、3 g/L マルトエキス、5 g/L バクトペプトン、10 g/L グルコース。

S D 培地：6.7 g/L アミノ酸不含イーストヨロジエンベース(Y N B)、20 g/L グルコース。アデニン含有培地の場合はアデニンを24 mg/L 添加する。S D プレートの場合は寒天を20 g/L になるように加える。

M 培地：0.5 g/L 硫酸マグネシウム、0.1 g/L 食塩、0.4 mg/L チアミン、0.4 mg/L ピリドキシン、0.4 mg/L パントテン酸カルシウム、2 mg/L イノシトール、0.002 mg/L ビオチン、0.05 mg/L 塩化鉄、0.07 mg/L 硫酸亜鉛、0.01 mg/L ホウ酸、0.01 mg/L 硫酸銅、0.01 mg/L ヨウ化カリウム、87.5 mg/L リン酸2水素カリウム、12.5 mg/L リン酸1水素2カリウム、0.1 g/L 塩化カルシウム、20 g/L グルコース。硫酸アンモニウム含有M 培地の場合は、1 g/L 硫酸アンモニウムを加える。硫酸アンモニウム及びアデニン含有M

30 培地の場合は、M 培地に1 g/L の硫酸アンモニウムと24 mg/L のアデニンを加える。

ポリエステル産生用培地：6.7 g/L Y N B、10 g/L カサミノ酸に炭素源として、n-アルカンあるいは油脂を20 g/L 添加する。

【0064】酵母の液体培養は、50 ml 試験管、500 ml 坂口フラスコあるいは2 L 坂口フラスコを用いて行った。50 ml 試験管の場合300 rpm、500 ml 坂口フラスコの場合100~110 rpm、2 L 坂口フラスコの場合90~100 rpm で振とう培養した。

40 培養温度は、液体培養とプレート培養とともに30°Cである。

【0065】(制限酵素処理) 制限酵素処理は、メーカーの推奨する反応条件、あるいはSambrook等編、Molecular cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) に記載の方法に従って行った。

【0066】本発明の実施において、多くの市販のキットを用いたが、特に断らない限り添付の使用説明書に従

って行った。

【0067】(実施例1)破壊用DNAの作製

ADE1遺伝子を含む大腸菌用ベクターpUC119-ADE1(Kawai S. 等、*Agri c. Biol. Chem.*、55:59-65(1991))(4.64 kbp)をMunI、HpaIで切断後、TAKARA Blunting Kit(宝酒造社製)を用いて平滑化処理を行う。平滑化処理を行った分割DNAを1%アガロースで電気泳動し、ベクター及びADE1両サイド側(4.19 kbp)とMunI/HpaI切断断片(550 bp)を分離する。ベクター及びADE1両サイド側をアガロースゲルよりEASYTRAP(宝酒造社製)を用いて回収し、TAKARA Ligation Kit Ver2(宝酒造社製)を用いてADE1両サイドを連結した。反応液を大腸菌コンビテントセルDH5α(宝酒造社製)100 μlに5%以下の溶液比になるように添加し、該大腸菌を形質転換した。LB培地を適量加え1時間振盪培養後、LBプレートに塗抹し37°Cで1晩培養する。出現したコロニーを数個得し、常法によりLB培地で培養し、培養菌体よりプラスミドDNAを抽出した。該プラスミドを制限酵素SalIで切断し、アガロースゲル電気泳動で1.03 kbpのバンドの出現を確認し、目的とする破壊用ベクターを得た。この形質転換した大腸菌をLB培地で大量培養し、Molecular cloning: A Laboratory Manual, Second Edition 1. 42-1. 47, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)に従って塩化セシウムによる超遠心法で該ベクターを大量に調製した。そして、直接破壊法を行うため、破壊用ADE1DNAをSalIで切り出した。全DNA量で5 mg/mlの水溶液に調製し、切り出したDNAは未精製のまま遺伝子破壊に用いた。

【0068】(実施例2)遺伝子破壊実験

キャンディダ・マルトーサIAM12247株をYM培地10 mlに植菌し1晩前培養した。次に、前培養液1 mlを100 mlのYM培地(500 ml坂口フラスコ)に植菌し、6時間培養後、遠心により集菌した。菌を1 Mソルビトール500 μlに懸濁し、破壊用DNA 100 μgを加え静かに攪拌した。

【0069】遺伝子導入は電気パルス法により行った。遺伝子導入装置はBTX社製のELECTRO CELL MANIPULATOR 600を用いた。キュベットはBIO MEDICAL CORPORATION CO. LTD製のBM6200を用いた。調製したコンビテント細胞/DNA溶液を100 μl取りキュベットに注入し、パルス装置にセットした。続いて、静電容量40 μF、抵抗値246 ohm、電圧1.9 KVの条件で電気パルスをかけた。パルス後、それぞれのキュベットに1 Mソルビトールを1 ml加え、穏やかに混合

し、室温で1時間放置した。その後、YM培地100 mlに移し1晩培養した。

【0070】(実施例3)破壊株のスクリーニング

次にYM培地で培養した菌を硫酸アンモニウム不含M培地50 ml(500 ml坂口フラスコ)に植菌し、1晩培養した。続いて硫酸アンモニウム含有M培地100 mlに懸濁し、6時間30°Cで培養した。この培養液にナイスタチン(シグマ社製)の3 mg/mlエタノール溶液を終濃度10 μg/mlとなるように添加し、1時間培養した。ナイスタチン処理菌を滅菌水で2回洗浄し、50 mlの滅菌水に再度懸濁した。この菌液をYPDプレートに塗抹した。30°Cで2日間プレートを培養したところ、赤色コロニーが24個得られた。これらの株はいずれもSD培地で生育できることを確認した。

【0071】(実施例4)PCR法による解析

多数の赤色コロニーからの破壊株の1次スクリーニングをPCR法用いて行った。得られた赤色コロニーをYPD培地で培養し、これより染色体DNAを染色体抽出キットのジェントルくん(宝酒造社製)を用いて抽出した。この染色体DNAを用いて、ADE1遺伝子の両端のプライマー(配列番号3及び配列番号4)を用いてPCRを行った。PCRはPerkin Elmer Amplitaq kitを用いて行った。遺伝子増幅はBiometra社製TRIO-Thermoblock™を用いた。94°C1分、50°C1分、70°C3分を1サイクルとして30サイクル行った。野生株では1.5 kbpのDNAが増幅され、遺伝子破壊株では1.0 kbpと短くなったDNAが増幅される。PCR反応液を1%アガロースゲルで電気泳動を行い、1.0 kbpのDNA断片の検出を行った。その結果24株中3株のADE1遺伝子が短くなっていると考えられた。図3に3株中2株のPCRパターンを示した。

【0072】(実施例5)ゲノミックサザンハイブリダイゼーション法による解析

これら3株の染色体DNAを染色体抽出キットのジェントルくん(宝酒造社製)を用いて抽出した。得られた染色体DNA 5 μgずつを3種類の方法、DraI、Dra + NdeI、NdeIで切断し0.8%アガロースゲルで電気泳動を行った。Molecular cloning: A Laboratory Manual, Second Edition 9. 31-9. 57, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)に従ってゲルからハイブリンドN+フィルター(アマシャム社製)に1晩トランスファーした。サザンプロット検出用プローブは、ADE1遺伝子内の配列であるHpaI NdeI断片(270 bp)をGeneImageラベリング・検出キット(アマシャム社製)で酵素標識したものを用いた。ハイブリダイズ後、洗浄し、同キットの蛍光発色試薬でDN

Aバンドを検出した。検出バンドを野生株IAM12247のものと比較したところ、2株がADE1遺伝子内部の550bp分が短くなってしまっており(図4)、染色体上のADE1遺伝子の破壊を確認できた。図5にサザンハイブリダイゼーションにより明らかになった、ADE1遺伝子破壊キャンドィダ・マルトーサ染色体の破壊されたADE1遺伝子付近の制限酵素地図を示した。553bpsはMunI-HpaI間の欠失した部分を示している。probeはサザンハイブリダイゼーションに用いた部分DNAを示している。図4に示したように、このプローブを用いた場合、染色体DNAの下側に記した塩基の長さが確認された。野生株IAM12247では、この値に553bps加えた値が確認された。

【0073】このようにして得られたADE1遺伝子破壊株の1株をキャンドィダ・マルトーサAC16と命名した。

【0074】(実施例6) ADE1遺伝子破壊株の増殖能の検討

遺伝子破壊AC16株の完全培地(アデニン(100mg/L)及びヒスチジン(100mg/L)含有YPD培地)での増殖能をIAM12247株及びCHA1と比較した。酵母をYPD培地10mlに植菌し、1晩培養後1%で同培地10mlに植菌した。一定時間ごとにOD600nmを測定した。その結果AC16株及び野生株は15時間で培養終期に達したが、AC16株は野生株の83%までしか増殖しなかった。一方、CHA1はAC16株と同等の濃度まで増殖したが、AC16株の方が6時間早かった(図6)。このように、AC16株の方がCHA1株より完全培地での増殖能が優れていることが示された。

【0075】(実施例7) ADE1遺伝子破壊株の油脂資化性の検討

遺伝子破壊株のなかでAC16株の油脂資化性能力を野生株IAM12247及びCHA1株と比較した。油脂は、バーム油、ヤシ油、及び炭素数14のn-アルカンであるテトラデカンを用いた。油2%を添加したYNB培地50ml(500ml坂口フラスコ)に植菌し1晩培養し、この菌液を同量の培地に10%植菌し、一定時間ごとにOD600nmを測定した。その結果、ヤシ油とバーム油では、今回取得したAC16株は野生株より15%程度増殖能が劣るが、CHA1株より4倍程度高い油脂資化能(32時間では6倍)を持っていることがわかった。テトラデカンの場合は、CHA1は油脂より高い増殖能を示したが、野生株の55%、AC16株の80%であった。このように、ADE1破壊株はCHA1株より油脂及びアルカン資化能力が優れていた。図7に各炭素源での増殖曲線を示した。

【0076】(実施例8) ポリエステル合成に関与する遺伝子の合成

ポリエステル合成に関与する酵素遺伝子として、アエロ

モナス・キャビエの由来のPHA重合酵素と、 $\beta$ 酸化経路の中間体のエノイルCoAをモノマーである(R)-3-ヒドロキシアルCoAに変換する(R)体特異的エノイルCoAヒドラターゼ(T. Fukui, et al FEMS Microbiology Letters, vol. 170, 69-75 (1999))のアミノ酸配列をもとに、当該酵素遺伝子を設計した。

【0077】塩基配列の設計に当たって、キャンドィダ・マルトーサはCTGコドンをロイシンではなくセリンに翻訳する酵母であるため、ロイシンコドンにはCTGを割り当てなかった。また、各アミノ酸に対応するコドンはキャンドィダ・マルトーサにおいて使用頻度の高いコドンを優先的に選択した。コドンの使用頻度はWolf K. 編 Nonconventional Yeasts in Biotechnology. の中のMauersberger S. 等著、Candida maltosa p524-527を参考にした。配列番号6及び7にそれぞれ設計したORF2とORF3を示した。この塩基配列にしたがってDNAを全合成した。

【0078】(実施例9) ポリエステル合成用組換えプラスミドの構築

前記ORF2、ORF3がキャンドィダ・マルトーサで発現するように、それぞれの5'上流にキャンドィダ・マルトーサのALK1遺伝子のプロモーターALK1p(配列番号8)を、3'下流にキャンドィダ・マルトーサのALK1遺伝子のターミネーターALK1t(配列番号9)を連結することにした。プロモーターおよびターミネーターと構造遺伝子を連結するための制限酵素部位を調製するためには、PCR法を利用した。PCRの条件は94°C1分、55°C2分、72°C3分を1サイクルとし、これを25回繰り返して、目的遺伝子断片を增幅した。ポリメラーゼは宝酒造(株)のExTaqを使用した。プロモーター部分は配列番号8を鋳型にして配列番号10と配列番号11を用いて、5'末端がSalI、3'末端がNdeIのALK1pを作製した。ターミネーター部分は配列番号9を鋳型にして配列番号12と配列番号13を用いて、5'末端がHindIII、3'末端がEcoRVのALK1tを作製した。最終的にORF2とORF3を連結するベクターにはpUC19にキャンドィダ・マルトーサの自己複製領域(ARS)(GenBank D29758)およびURA3遺伝子(GenBank D12720)を連結したpUTU(M. Ohkuma, et al., J. Biol. Chem., vol. 273, 3948-3953(1998))とキャンドィダ・マルトーサのADE1遺伝子を用いて、マーカー遺伝子をウラシルからアデニンに変更したベクターであるpUTA1(図2下)を使用した。pUTA1は、pUTU1からXbaIを

50用いてURA3遺伝子を除去し、これにSalIを

用いて切り出したA D E 1 遺伝子断片を接続し構築した。

[0079] pUCNT (WO94/03613に記載) のPvuII、NdeIサイトにALK1pを結合し、またpUCNTのHindIII、SspIサイトにALK1tを結合してpUAL1を構築した。次にpUAL1のNdeI、PstIサイトにORF2を結合し、プラスミドpUAL-ORF2を構築した。また、pUAL1を構築する途中に構築するpUCNT-ALK1tのNdeI、HindIIIサイトにORF3を結合し、さらにALK1pを結合することで、pUAL-ORF3を構築した。

[0080] つぎに、プラスミドpUAL-ORF2からEcoT22Iを用いて、ORF2とともに上流にあるプロモーター、下流にあるターミネーターと一緒に切り出し、pUTA1のPstIサイトに結合し、pUTA-ORF2を構築した。さらに、pUAL-ORF3からSalIを用いてORF3とともに上流にあるプロモーター、下流にあるターミネーターと一緒に切り出し、pUTA-ORF2のSalIサイトに結合したプラスミドpUTA-ORF23(図2上)を構築した。以上のように、キャンディダ・マルトーサにおいてポリエステルを製造するための遺伝子発現カセットを構築した。

[0081] (実施例10) ポリエステル產生用形質転換株の作製

AC16株及びCHA1株への形質転換は、当該酵母をYM培地でOD600nmが0.8~1.0になるまで培養し、遠心により菌体を回収した。この菌体に上記の発現ベクターを導入した。遺伝子導入に際して、コンピテント細胞の調製から遺伝子導入までGENOTEC H社製Fast Track™-Yeast Transformation,™ Kitを用いて行った。遺伝子導入した菌体をM培地プレートに塗抹し2日間培養した。pUTA-ORF23にはA D E 1 遺伝子が組み込まれているため、アデニンの合成ができる。従って、アデニン不含の培地で生育する菌が形質転換体である。アデニン不含の培地より生育した菌を回収し、形質転換体AC16(ORF23)株とした。同様にCHA1株からCHA1(ORF23)株を得た。また、ポリエステル合成酵素を含まないコントロールベクターpUTA1を用いて、同様にAC16株とCHA1株を形質転換し、形質転換体AC16(CT)株、及びCHA1(ORFCT)株を得た。

[0082] (実施例11) ポリエステル生産培養

ポリエステル生産のための本培養はすべて2L坂口フラ\*

<110> 鐘淵化学工業株式会社 KANEKA CORPORATION

<120> 遺伝子破壊株

<130> TKS-4360

<160> 13

\*スコを用いて行った。まずSD培地10mlに各組み換え株のグリセロールストック100μlを植菌し、1晩培養した。培養した酵母菌はグルコース飢餓用の硫酸アンモニウム含有M培地(100g/L硫酸アンモニウム添加)50mlに1mlを植菌した。この培地で2日間培養し、培地中のグルコースを完全に枯渇させる。次にこの菌10mlをポリエステル產生用培地50ml(500ml坂口フラスコ)に植菌し、8時間培養後、同じポリエステル產生用培地500mlに全量植菌し本培養を行った。本培養は120時間行った。培養液をオートクレーブ後、遠心分離によって菌体を回収し、メタノールで洗浄した後、凍結乾燥した。得られた乾燥菌体を粉碎し、クロロホルムを100ml添加し1晩攪拌してポリエステル抽出操作を行った。クロロホルム溶液を濾過により回収しエバボレーターで1~2mlにまで濃縮後、濃縮液に10mlのヘキサンを添加してヘキサン不溶物を析出させた。AC16(ORF23)株は沈殿物が得られたが、CHA1(ORF23)株では痕跡程度の沈殿しか得られなかった。AC16(CT)株では沈殿物は全く得られなかった。AC16(ORF23)株から得られたヘキサン沈殿物を乾燥後、400MHzプロトンNMR分析(JEOL、JNM-EX400)を行った。図8にNMRチャートを示した。また、各ピークとポリエステルP(3HB-co-3HH)のプロトンとの対応を番号で示した。解析から3HH分率は9.7%であった。また、ポリエステルの生産量は酵母乾燥重量の0.1%であった。CHA1(ORF23)株でも同様にポリエステルが確認できたが生産量は0.05%以下であった。これより、本発明のキャンディダ・マルトーサのA D E 1 遺伝子破壊株を用いて共重合ポリエステルP(3HB-co-3HH)が生産できることがわかった。さらに、本破壊株形質転換体は突然変異処理により得られたA D E 1 遺伝子変異酵母のCHA1よりポリエステル生産能力に優れていることが示され、本発明のA D E 1 遺伝子破壊酵母の有用性が明らかになった。

[0083]

【発明の効果】本発明により、酵母のA D E 1 遺伝子が破壊された菌株の有用性が示された。キャンディダ・マルトーサのA D E 1 遺伝子破壊株では、遺伝子組換え用宿主酵母として、遺伝子の発現や遺伝子の発現産物の製造に用いることが期待できる。さらに異なる栄養要求性を附加することも可能であり、組換え体として安全に使用できる酵母の開発に繋がる。

[0084]

【配列表】

23

24

<210> 1  
 <211> 1820  
 <212> DNA  
 <213> Candida maltosa  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> 538..1413  
 <223> Ade1  
 <400> 1  
 gatcccccttc ttcaaacctt taaatqacat tqtttcgttt ctctatqttt qgtatcqgtt 60  
 cttcttcttc ttcaaaaaaa aqqqqqqcac tattcaaaaa aaaatattat aacaqtatqa 120  
 ttttttccc tctcccgctc attqaggtt ttttttctc tttcqcttq gtctttqct 180  
 tttcactcca aaaatggaaa cacgcgcgqc tcaactcgaa atccgtqatc aaaaaaataa 240  
 aggctqtgag tttcgagcca ataattatqa attagtggta ttttttttaa agataaataa 300  
 tcaaaqatcq cattagggqaq acqaatatqc qttattcaaa taaaaaqaca attcttttag 360  
 qgttagcattt cccttcaagt tcatcccaca tqtacattaa tqtcaatqat qtcqcaqaaq 420  
 ttaaattatqc aqaqaaaaaa aaaaatgtqa attactccga gtcaactctt ctttcttc 480  
 ttcttttctc tctttatcac cataatcacc accaccacca ccaccaccaq ctcccqatq 540  
 acttcaacta acttagaagg aacttccca ttgtattgcca aqgtaaaqt caqagatatt 600  
 taccaagttq acgacaacac cttttattt qttqctactq atagaatttc cgcatcagat 660  
 qtqattatqt ctaatqgtat cccaaataaa qgtaaaatct taaccaaattt qtctqaattc 720  
 tqggttqatt tcttgccaaat tqaaaaccat ttaatcaaaq gqagacattt cccaaaatatt 780  
 cctcaactaq aaccatataq aaaccaattq gaaqgcagat ctttacttgt tagaaaattq 840  
 aaattgtatcc ctcttqaqt tattqttqa qgttacatca ccqgttccq ctqgaaqaa 900  
 tacccaaaat ctaaaaccgt ccacggattt ccttattqgtq atgtqgttqa atcacaacaa 960  
 atcaactccta tcttcaccccc atccactaaa qcagaacaqat gtaacatqat tqaaaatatc 1020  
 accaaqaac aqgtqacaa qattqttqa aaaaqattat qtqataqaaat tqaaaaattt 1080  
 qctattgatt tgacaccaa aqccqagat tacqctqccca cttaaaggaaat tattatcqct 1140  
 gatactaaat ttgatattqg tttqatqgtq gacaacatq ttttqttqa cgaagttta 1200  
 actccqattt ctccqattt ctqaaataq qctaaataq aqgtqgttqaa atctcaaqac 1260  
 tcttacgata aacaattttt qagaqatttq ttaacttctt atqgtqttq tttqaaqat 1320  
 qgtgttqctt tgcctqagaqatttqactt qaaaccaaga qcaaaatctt tttqaaqat 1380  
 qaaaattttt ctqgtqacaa atqgcaaqaa taaattaqat atatcttata tttaaqcttt 1440  
 ctatattatcc caaacttcg tagtatttt tqacatqttc agatqttttt actttatctt 1500  
 tcctqaaattt tttqatttctt aaccqactt tqcatgtqct tttqataat qcaacatqat 1560  
 cttgaccattt aqcaaaactt ctacctaaat ctatattqac tttqccaaat qtttqacattt 1620  
 gqactttqgtq gatcqcacatc qccacgaca agatcatttq gtttqttttt atqgtqgttq 1680  
 attqgacattt qgtqcaacttq atqgtttaac ttqgaaqaa qctaaqaaat tqaqacttq 1740  
 qaattqaaqaa cgtqcatctq atttcaattt qqgtqaaqaa ttqacttata cttqttataa 1800  
 aatgtatcat qatqttqatc 1820  
 <210> 2  
 <211> 1032  
 <212> DNA  
 <213> Candida maltosa  
 <400> 2  
 attataacq tatqattttt ttccctctcc cqtcqattqg qgtttttttt ttcttttcttq 60  
 ttttqgttctt ttqcttttca ctccaaaaat qgaaacacqg qcgqctcaac tcgaaatccg 120  
 tttatcaaaaa aataaaaggctt qtgatqtttq aqccaataat tatqatatttq tttqattttt 180  
 tttaaaqata aataatcaq aatcqcattt qggagacgaa tatqcgatqat tcaaataaaa 240  
 agacaattctt tttaqggtagt cattttccctt caagttcatc ccacatqatc attaatgtca 300

25

26

atqatgtcqc aqaqtaaa ttaqcaqaq aaaaaaaaaa tqtqaattac tccqagtcaa 360  
 ctcttccttc tcttcttctt ttccattttt atcaccataa tcaccaccac caccaccacc 420  
 accaqctccc agatqacttc aactaactta qaagqaactt tcccattgat tqccaaaggt 480  
 aaagtcaqaaq atatttacca aqttqacqac aacactctt tattcqttgc tactqataqa 540  
 atttccgcat acqatgtqat tatqatctaat ggtatccaa ataaaggtaa aatctaacc 600  
 aaattqtcctq aatttcqqtq tqatttcttq ccaattaact tctaattqttq ttqctqtaa 660  
 agatqqtgtt qctatqctq aagacattq cactqaaacc aaqagcaaat acqttqaaqc 720  
 ttacqaaaat ttaactqgtt acaaattqca aqaataaattt aaggatattt attattaaag 780  
 ctttctattt atcccaaact ttcqtagtat tttctqacat gttcaqatgt ttttacttta 840  
 tcttccttq aatttttqat ttcttaccqat ctcttqcatq taqctttqta taatqcaaca 900  
 tatqcttqac cattagcaaa acttctaccc aatcttattt tqactctqtc caaaqtttqta 960  
 ctttqaaqttt tqttqatqca catcqccac qacaagatca tttqgtttgt ttttattqgtq 1020  
 ggttattqgc ac 1032

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer

&lt;400&gt; 3

taacagtatq atttttttcc ctct

24

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer

&lt;400&gt; 4

aacaaaccaa atqatcttq cgtq

24

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 264

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Candida maltosa

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;223&gt; probe

&lt;400&gt; 5

aacttctaat qqtqttqctq qtaaaqatqg tqttqctatq cctqaagaca ttqtcactqa 60

aaccqaqacg aaatacqttq aagcttacga aaatttaact ggtqacaaat qqcaagaata 120

aattaaqqat atcttattt aaaaqtttctt atttatccca aactttcqta qtattttctq 180

acatqttcaq atqtttttac ttatcttcc ctqaaatttt tqatttctaa ccqactcttq 240

catqtaqctc ttgataatqc aaca 264

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 1785

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; 1..1785

27

28

&lt;223&gt; ORF2

&lt;400&gt; 6

atq tct caa cca tct tat ggt cca ttg ttc qaa gct ttg qct cat tac 48  
 aat gat aaa ttg ttg gct atg gct aaa gct caa acc qaa aga act gct 96  
 caa gcc ttg ttg caa act aac ttg gat gat ttg ggt caa gtt ttg gaa 144  
 caa ggt tct caa caa cca ttg caa ttg att caa gct caa atq aat ttg 192  
 ttg caa gat caa tta aaa ttg atq caa cac act ttg tta aaa tct gct 240  
 ggt caa cca tct gaa cca gtt att act cca gaa aga tct gat aga aga 288  
 ttt aaa gct gaa gct ttg tct gaa caa cca att tat gat tac tta aaa 336  
 caa tcc tat ttg tta act gct aga cat ttg ttg gct tct gtt gat gct 384  
 ttg gaa ggt gtc cca caa aaa tct aga gaa aga ttg aga ttc ttt act 432  
 aga caa tac gtc aac gct atq gct cca tct aat ttc ttg gct act aac 480  
 cca gaa ttg tta aaa ttg act ttg gaa tcc gat ggt caa aat ttg gtt 528  
 aga ggt ttg gct tta ttg gct gaa gat ttg gaa aga tct gct gat caa 576  
 tta aac att aga ttg act gat gaa tcc gct ttt gaa tta ggt aga gat 624  
 ttg gct ttg act cca ggt aga gtt caa aga act gaa tta tat gaa 672  
 tta att caa tac tct cca act act gaa acc gtt ggt aaa acc cca gtt 720  
 ttg atc gtt cca cca ttc att aat aaa tat tac att atq gat atq aga 768  
 cca caa aac tcc ttg gtc gct ttg ttg gtc gct caa ggt caa acc gtt 816  
 ttc atq att tcc ttg aga aac cca ggt gtt gct caa gct caa att gat 864  
 tta gat gat tat gtt gtt gat ggt gtc att gct gct ttg gat ggt gtt 912  
 gaa gcc gct act ggt gaa aga gaa gtt cac ggt att ggt tac ttt att 960  
 ggt ggt acc gct ttg tct tta gct atq ggt ttg ttg gcc gcc aga aga 1008  
 caa aaa caa aga gtt aga act gct act ttg ttt act act ttg ttg gat 1056  
 ttc tcc caa cca ggt gaa ttg ggt att ttg att cat gaa cca att atc 1104  
 gcc gcc tta gaa gcc caa aat gaa gct aaa ggt att atq gat ggt aga 1152  
 caa ttg gcc gtc tcc ttc tct ttg ttg aga gaa aac tct tta tat ttg 1200  
 aat tac tat att gat tct tac tta aaa ggt caa tct cca gtt gct ttt 1248  
 gat ttg ttg cac ttg aac tct gat tct act aat gtt gcc ggt aaa act 1296  
 cat aac tct ttg ttg aga aga tta tat ttg gaa aat caa ttg gtt aaa 1344  
 ggt gaa tta aaa att aga aac act aga att gat tta ggt aaa gtt aaa 1392  
 act cca gtt ttg ttg gtt tct gcc gtt gat gat cac att gct tta ttg 1440  
 caa ggt acc ttg caa ggt atq aaa ttg ttc ggt ggt gaa caa aga ttt 1488  
 tta ttg gcc gaa tcc ggt cat att gct ggt att ttg aat cca cca gct 1536  
 gct aac aaa tac ggt ttc ttg cac aat ggt gct gaa gct qaa tct cca 1584  
 gaa tct ttg ttg gct ggt gcc acc cat caa ggt ggt tcc ttg ttg cca 1632  
 gaa atq atq ggt ttg att caa aac aga gat gaa ggt tct gaa cca gtc 1680  
 cca gcc aga gtc cca gaa gaa ggt ttg gct cca gct cca ggt cac tat 1728  
 gtc aaa gtt aga tta aac cca gtt ttc gct ttt cca acc gaa gaa gat 1776  
 gct gct taa 1785

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 405

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; 1..404

&lt;223&gt; ORF3

&lt;400&gt; 7

atq tct gct caa tcc ttg gaa ggt ggt caa aaa gct aga tta tct aaa 48

29

30

aqa ttc qqt qcc qaa qtt qct qct ttt qct qcc tta tct qaa qat 96  
ttc aac cca ttq cac ttq qat cca qct ttt qct qct act acc qcc ttc 144  
qaa aga cca atc gtc cat qqt atq ttq tta qct tct tta ttt tcc qgt 192  
ttq ttq qgt caa caa ttq cca qqt aaa qgt tct att tat ttq qgt caa 240  
tct tta tct ttc aaa ttq cca qtc ttt qtc qgt qat qaa qtt acc qct 288  
qaa qtt qaa qtt act qct ttq aqa qaa qat aaa cca att qct act ttq 336  
act act aqa att ttc act caa qgt qgt qct tta qct qtt acc qgt qaa 384  
act qtt qtc aaa ttq cca taa 405

<210> 8

<211> 1017

<212> DNA

<213> Candida maltosa

220

<223> promoter ALK1p

<400> 8

atqcatqaac aqgatataat cccaaqaaaa aagtctattt tctatTTca caaqggaaaact 60  
ggaaaaacct ttttgtgttt tqaagtagt ccgtataaac ctgtaaaaaaaa ataaattttq 120  
aagatttgac ttgtctgtatc aaatgtctatc agttagtgc tagactttqat actagactat 180  
gtatggcaaca catqgtqgtc aacgtqcaag acatcaccca atqagaqagac tqctaaccag 240  
aaaaaaaaqq qgacaaaaga aaaactcgaq agaaaaaagtc aattttqgtq aaaaatttqgtc 300  
atttttqgtt ctttccataat gggggaaattt atttgtttaaa attccagttt ttccagqgtt 360  
aagatttcga ccaatttattt ttaatccata tqaatcttcat cattatcaac ttgtqaaaaa 420  
taataatcga ggtacgttta atacqagata tttagtctacg gctatgtatg ttggatatac 480  
ttcatttqacq atcagaqacq tqaatttqgtt ttcaqgtqca tqtgtqgata taaacccaaac 540  
aaatttatcta qcactgtqc cttccccaca ttgtqaaaaa aacccctaaa qcataattttt 600  
atctggataa ataaatcatt catttcacat tttccggttt gtataagggtt tttttaaattt 660  
ttttttacag tttagccctt tcaatttacca aatacqgtt aaatgtqctt tgtaacatqc 720  
agggggatttt ctccgtgtc qtttttccca catgttttta atgtgtataata aattttaaaaa 780  
attacaaaga aaaaccqccata tataaqqccatc qqagtttaca ttgttaacta actqcaaaat 840  
qqcgatgttt caaatcaaca aaattttaaa aacccccc aaaaaaagtat catataattt 900  
aaactcaaaa tccttttqat tgcataaaaat tttttaaatct cttttttttt ttcttttttta 960  
ctttcttattc tatttcttattc tttttttata tatctaatc atttataaca tctggtc 1017

<210> 9

<211> 218

<212> DNA

<213> Candida maltosa

220

<223> terminator ALK1t

<400> 9

ataqatqqat ttttctttt tatqtqtatt tcggtaat aaatgtttaa atttttttt	60
taataaaaat atttqtagtt atttatatatqc aaaaaaaaaa aatattcaaa qcaacttcc	120
tttcttcctt tatctttccc ccatqctaag qtctaaaaca ccacaactta aaacccaact	180
taaccqata atactaaqat caatctccaa agatqcat	218

<210> 10

<211> 46

<212> DNA

### <213> Artificial Sequence

220

31

&lt;223&gt; primer

&lt;400&gt; 10

tttttcaact ggagctcqtc qacatqcatq aacaggattt aatccc

46

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 39

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer

&lt;400&gt; 11

ccqqaattcc atatqcaqat gttataaatq aattaqata

39

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer

&lt;400&gt; 12

cqgaaqctta tagatggatt tttctttttt at

32

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 45

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer

&lt;400&gt; 13

tttttqatatac gagctcqtcq acatqcatct ttggagattt atctt

45

## 【図面の簡単な説明】

【図1】 pUC119-ADE1の簡単な図及びADE1破壊用DNAの作製法を示してある。

【図2】 本発明で用いた、アエロモナス・キャビエ由來のポリエステル重合酵素とエノイル-C<sub>0</sub>Aヒドラターゼ発現カセットpUTA-ORF23(図2上)、及び、両酵素発現遺伝子を含まないコントロールカセットpUTA1(図2下)を示してある。

【図3】 PCR法による、ADE1遺伝子破壊株の1次スクリーニングの結果を示してある。C16及びC17が破壊株と考えられた。

【図4】 ゲノミックサザンハイブリダイゼーション法によるADE1遺伝子破壊の確認を示してある。C16及びC17が正常に破壊されていた。

\* 【図5】 サザンハイブリダイゼーションにより明らかになった、ADE1遺伝子破壊キャンディダ・マルトーサ染色体の破壊されたADE1遺伝子付近の制限酵素地図を示してある。

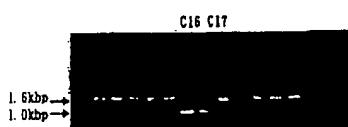
【図6】 ADE1遺伝子破壊株AC16のYPD培地での増殖曲線を示してある。

【図7】 ADE1遺伝子破壊株AC16のヤシ油、バーム油、及びテトラデカンを炭素源としたときの増殖曲線を示してある。

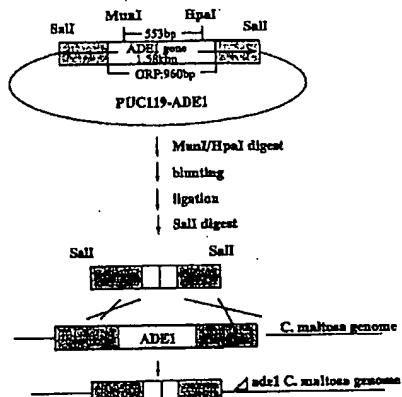
【図8】 AC16(ORF23)株で生産したポリエステルP(3HB-C<sub>0</sub>-3HH)の400MHzプロトンNMRのチャートを示した。また、ポリエステルの各プロトンの帰属を番号で示してある。

\*

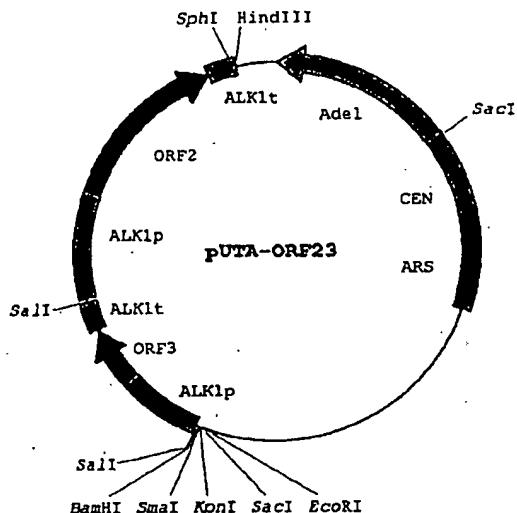
【図3】



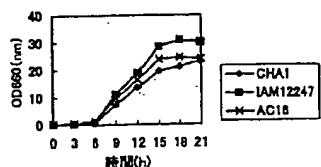
[図1]



[図2]

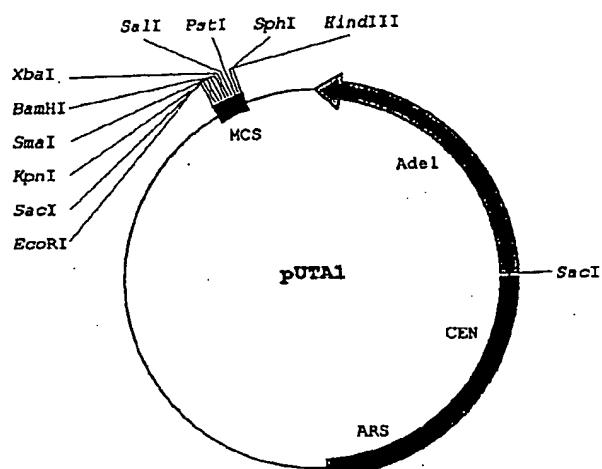
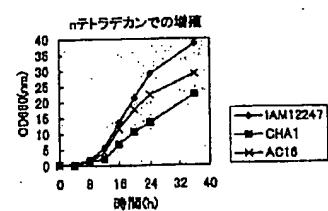
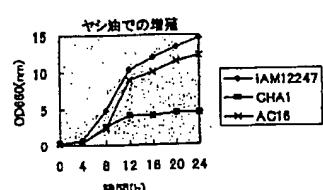
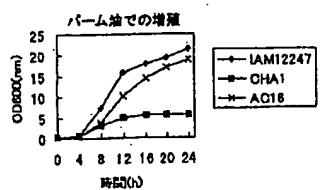


[図6]

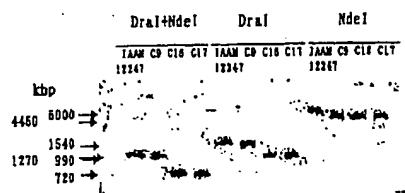


ORF 2 : ポリエステル重合酵素  
ORF 3 : (R) 体特異的エノイル-CoAヒドラターゼ

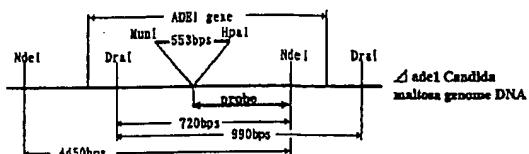
[図7]



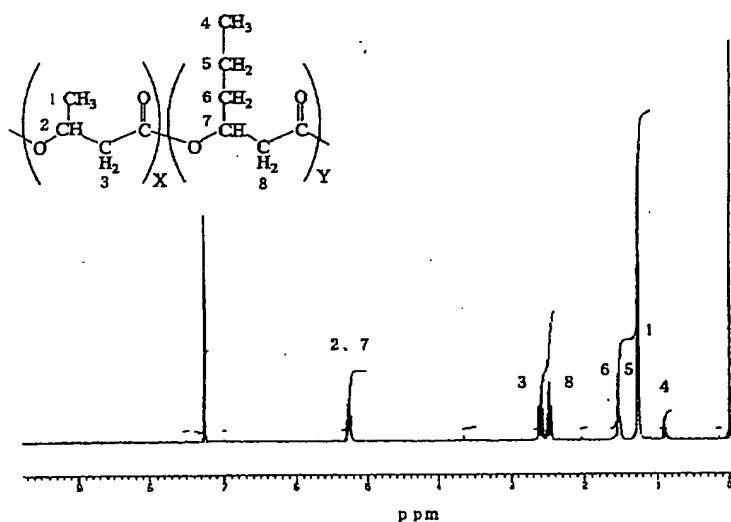
[図4]



[図5]



[図8]



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.

(C 12 P 7/62  
C 12 R 1:72)

識別記号

F I

C 12 R 1:72)  
C 12 N 15/00

マーク(参考)

Z N A A

(72)発明者 高木 正道

東京都府中市栄町1-31-10

(72)発明者 太田 明徳

埼玉県大宮市プラザ57-2

F ターム(参考) 4B024 AA17 AA20 BA07 BA80 DA12

CA11 HA20

4B064 AD83 CA06 CA19 CB24 CC24

DA20

4B065 AA10Y AA73X AB01 AC20

BA02 CA12 CA54